

悪性リンパ腫及びリンパ性白血病の 遺伝子解析による診断

小野寺 一 史 今 信一郎

札幌医科大学病理学第1講座

Diagnosis of Malignant Lymphoma and Lymphatic Leukemia by Detection of Gene Rearrangement

Kazuhumi ONODERA and Shinichiro KON

Department of Pathology (Section I), Sapporo Medical College

(Chief : Prof. K. KIKUCHI)

ABSTRACT Specimens from malignant lymphoma and leukemia cases were analysed by immunohistochemistry and Southern blot analysis. Monoclonal antibodies against B or T lymphocytes were used to determine their phenotype, and probes against JH, C κ , C λ and C β 2, J δ 1, J δ 2 were used to detect the gene rearrangement of immunoglobulin (Ig) and T cell receptors (TCR), respectively. Cases which did not express any cell lineage specific antigens were also diagnosed by detection of the gene rearrangement band of Ig or TCR by Southern blot analysis.

Three cases showed both Ig and TCR gene rearrangement with either a B or T cell phenotype. One, diagnosed as hairy cell leukemia with its histological feature and surface phenotype, showed more aggressive clinical course than that of the other cases we examined. One case, diagnosed as Adult T cell Leukemia (ATL) with high titer of anti-ATL antigen (ATLA), showed atypical monocytic leukemic cells, which had vacuoles in the cytoplasm, together with typical ATL cells with lobulated nuclei. Another case was non Hodgkin's lymphoma, diffuse large T cell type. These cases suggested the necessity of analysing both genotypes even in cases expressing an apparent phenotype, because it may help to predict its clinical response and histocytological variations.

Furthermore, genotype analysis made it possible to diagnose angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia (AILD) by detecting monoclonal proliferation of T lymphocytes. In our analysis, a δ chain rearrangement was also observed in one unusual case.

In addition, using polymerase chain reaction (PCR), we found a low frequency of bcl-2 gene rearrangement in the case of follicular lymphoma and the possibility of relevance of EB-virus in non-B lymphoid disorders.

(Received July 26, 1991 and accepted August 19, 1991)

Key words : Gene rearrangement, Ig, TCR, AILD, EBV, PCR

1 緒 言

リンパ性悪性腫瘍に対する診断法は大きく分けて3つの段階を経て来ている。まず始めは、形態学的検索による診断である。形態学的検索では、芽球化や活性化による形態学的変化を正しく捉えることが困難であり、時に主観的にならざるを得なかった。次に単クロー

ン抗体が開発されたことによる免疫組織学的診断である。数多くのリンパ球表面抗原に対する単クローン抗体の開発によりT、B細胞系列のみならず分化、成熟段階をも規定しうる詳細な分類及び診断を客観的に行うことが可能となった^{1)~5)}。しかし、単クローン抗体で認識される抗原は、リンパ性悪性腫瘍に特異的ではなく、1種類の単クローン抗体のみで診断することは不

可能であり複数の単クローン抗体を組み合わせる必要があった。また、ごく幼若なリンパ球の腫瘍ではB、T細胞の特異的抗原を発現していないものもあり単クローン抗体のみでは診断がつけられず、より確実なる診断法の出現が望まれたのである。

最近の分子生物学的手法の発展により、免疫グロブリン(Ig)遺伝子再構成の検出はB細胞への分化が既定された細胞の同定を可能にし、また、Tac、W. Macら⁶⁾およびDavid、M. M.らによるT細胞受容体(TCR)遺伝子のクローニングによりT細胞においてもB細胞と同様にTCR遺伝子に再構成が見られることが判明した。その成果はすぐにリンパ性悪性腫瘍及び腫瘍性血液疾患の診断、解析に応用された。Ig遺伝子及びTCR遺伝子の再構成を検索することにより細胞系列特異的な抗原を発現していない症例における細胞系列の決定と、細胞の単クローン性増殖の証明が可能となり、遺伝子検索によるリンパ性悪性腫瘍の診断、分類、解析が行われることとなった⁷⁾。

我々もこの遺伝子診断の技法を取り入れ、リンパ性悪性腫瘍の診断を行ってきた。今回、我々は十数種の単クローン抗体を用いた免疫組織学的解析とIg遺伝子に対してJ_H、C_κ、C_{λ2.4}、C_{λ3.5}、TCR遺伝子に対してC_{β2}、J_δ、J_{δ2}の各種プローブを用いた遺伝子再構成の検索を組み合わせたリンパ系悪性腫瘍の解析を行い病理組織像、臨床経過と併せて検討した。

この結果、表現型で診断のついた症例でIg遺伝子もしくはTCR遺伝子の一方のみ再構成を認めた症例は、すべて表現型と遺伝子型が一致し、細胞表面形質の検索ではその細胞起源が決定不能であった症例においても、Ig遺伝子およびTCR遺伝子の再構成を検出することにより細胞系列の決定が可能となった。また、少量の腫瘍細胞と多彩な反応性増生像を特徴とする血管免疫芽球性リンパ節症(IBL)においてもTCR遺伝子の再構成検出によりT細胞性腫瘍であることを診断し得た。

このような遺伝子再構成の詳細な検索は診断の確定、治療効果の予見やリンパ系細胞の分化成熟過程の解析に有効な手段であることが確認された。

また、ポリメラーゼチェーン反応(PCR)の利用によるbcl-2遺伝子の再構成の検討や、EBウィルスゲノムの検出を行いリンパ系疾患との関連を検討した。以上よりリンパ性悪性腫瘍に対する遺伝子診断の有用性が確かめられたので報告する。

2 実験方法

2.1 使用組織

2.1.1 末梢血・骨髓液

急性リンパ性白血病を主とする患者末梢血および骨髓液のリンパ系細胞はヘパリンを加えFicoll-Conray(比重1.080)比重遠心法により分離された。Phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4にて洗浄後約 1×10^7 個/mlの濃度に調整し蛍光抗体法に用いた。

2.1.2 リンパ節

外科的処置により採取されたリンパ節は分割しホルマリン固定による病理組織像の検索、液体窒素凍結による表面マーカーの検索、DNA抽出によるサザンブロット法、PCRに用いた。

2.2 蛍光抗体法

白血病細胞浮遊液は間接蛍光抗体により細胞表面抗原を検出した。 $0.5-2.0 \times 10^6$ 個/mlの細胞に下記の単クローン抗体を加え4℃、40分反応後PBSにて洗浄し、次いでFluorescein isothiocyanate (FITC) conjugated goat anti-mouse Igを混和し4℃、40分反応後再びPBSにて洗浄した。蛍光強度および陽性細胞数はFACStar (Becton-Dickinson)にて解析した。

単クローン抗体は当教室で作製したものを中心として下記のものを使用した。

L1⁸⁾ (CD5), L2 (CD8), L3 (CD4), L4 (CD38), L6⁹⁾ (CD1), L9¹⁰⁾ (medullary thy. T and B), L10 (CD25), T3 (CD3), MY7 (CD13), J5 (CD10), B1 (CD20), B4 (CD19), Ia (HLA-DR), L26²⁾¹¹⁾ (CD20), L27²⁾ (CD20), L28¹²⁾ (human IgM), L29⁵⁾ (activated lymphocyte), L30⁵⁾ (resting B), Ki-1 (CD30)

2.3 酵素抗体法

液体窒素にて凍結したリンパ節組織の薄切切片を作製し、冷アセトン10分固定後、上述の各種単クローン抗体と反応させた。次にPBSにて洗浄しBiotynyl horse anti-mouse Igを反応させ、PBSによる洗浄後Avidine-Biotin-Peroxidase Complexを反応させた。その後PBSにて洗浄し、ペルオキシダーゼ反応基質液(0.01% H₂O₂ 加 3.3'-diamino-benzidine 液)、(pH 7.6)中で発色させた。

2.4 サザンブロット法

2.4.1 DNA抽出法

リンパ節は液体窒素凍結下で粉末にし、10倍量のlysis buffer (1% N-lauryl-sarcosine, 10 mM EDTA, 100 mM Tris-cl (8.0), 200 mM NaCl,

400 mM Urea) に溶解した。浮遊細胞は 5×10^5 個/ml を 1 ml の lysis buffer に浮遊させた。いずれも、RNase を 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え、55°C で 1.5 時間反応させ、さらに、proteinase K を 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 加え 55°C で 3-5 時間反応させた。次にこの溶液を等量のフェノール、フェノール/クロロホルム、クロロホルムにて二回ずつ抽出し、消化された蛋白質などの夾雑物を除去した。この DNA 溶液に 1/10 量の 3 M Sodiumacetate と 2.5 倍量の冷エタノールを加え DNA を析出させ 70% エタノールで洗浄後、乾燥させ、10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE) に溶解し DNA 濃度がほぼ、500-1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるよう調整した。

2.4.2 使用 probe および制限酵素消化

使用した probe は 7 種類であり、Ig 重鎖に対しては J_H^{13} , $Ig\kappa$ 鎖に対しては $C\kappa^{13}$, $Ig\lambda$ 鎖に対しては $C\lambda_{2,4}^{13}$ と $C\lambda_{3,5}^{13}$, $TCR\beta$ 鎖に対しては $Jur\beta_2^{61}$, $TCR\delta$ 鎖に対しては $J\delta_1^{14}$ と $J\delta_2^{14}$ を使用した。試料 DNA は 10 μg を制限酵素 (60 unit) により 37°C, 12 時間消化した。使用した制限酵素は BamHI, EcoRI, HindIII の 3 種類であった。

2.4.3 プロッティングおよびプローブの標識

制限酵素で消化した DNA は 0.7% アガロースゲルにおいて 50 V, 15 時間泳動し、0.4 N NaOH により Nylon membrane (Pall Biosupport[®]) にトランスファーした。なお、水流を利用した Vacu Blot[™] の使用によりトランスファーに要する時間は約 1 時間に短縮された。

Membrane は salmon sperm DNA と 50% Formamide 6×SSPE を含む Pre hybridization solution と 42°C, 12 時間反応後、random hexamer 法¹⁵⁾ により ^{32}P -dCTP で標識されたプローブを加え反応させた。42°C, 24 時間反応後洗浄し、プローブが反応した特異的なバンドを Kodak X-AR[®] フィルムによるオートラジオグラフィーにて検出した。露出は 24-72 時間行った。

2.5 PCR

2.5.1 bcl-2

第 18 染色体上に存在する bcl-2 遺伝子の Major breakpoint region (MBR) と第 14 染色体上の免疫グロブリン J 領域に対するオリゴヌクレオチドを DNA Synthesizer (PCR-MATE, Applied Biosystems[®]) により合成し primer とした¹⁶⁾。尚、前者を primer 1, 後者を primer 2 とする。又、増幅領域中の核酸配列に対応するオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブとして用いた。

Primer 1: 5'-TTAGAGAGTTGCTTTACGTG-3'

Primer 2: 5'-ACCTGAGGAGACGGTGACCAGGGT-3'

Probe : 5'-GCCTGTTTCAACACAGACCC-3'

耐熱性 DNA ポリメラーゼを用い DNA Thermal Cycler (Perkin-Elmer-Cetus) にて 94°C 1 分, 60°C 2 分, 72°C 3 分で 25 回増幅し、増幅産物はアガロースゲル電気泳動、及び、サザンブロット法により解析した。

2.5.2 EBV

EB ウィルスゲノム遺伝子の検出にはウィルスの internal repeat I 内の二箇所に対するオリゴヌクレオチドを合成し primer とした¹⁷⁾。又、増幅領域中の核酸配列に対応するオリゴヌクレオチドをハイブリダイゼーションプローブとして用い、bcl-2 と同様に検出した。

Primer 1: 5'-CCAGACAGCAGCCAATTGTC-3'

Primer 1: 5'-GGTAGAAGACCCCTCTTAC-3'

Probe : 5'-CCCTGGTATAAAGTGGTCCT

GCAGCTATTTCTGGTCGCAT-3'

3 成績

3.1 全症例の病理組織学的分類および遺伝子型の分類 (Table 1)

当教室で解析した症例は 218 例であり、悪性疾患の中では B 細胞型が 54 例と最も多く、このうち 22 例に対し遺伝子の検索を行い、Ig 重鎖かつ軽鎖、もしくはそのいずれかの遺伝子に再構成の認められたものは 21 例あり、95% (21/22) が遺伝子型でも B 細胞型と診断することができた。T 細胞型は 34 例で、免疫芽球性リンパ節症様 T 細胞リンパ腫 (IBL-T) が 4 例含まれていた。T 細胞型腫瘍からは 9 例の遺伝子を検索し 7 例に $TCR\beta$ 鎖もしくは $TCR\delta$ 鎖、またはその双方に再構成を起こしており、78% (7/9) が遺伝子型でも T 細胞型と判定し得た。また、B 細胞型腫瘍で 1 例、T 細胞型腫瘍で 2 例に二重遺伝子型が見られたが、いずれの遺伝子にも再構成の認められなかった例はなかった。分類不能型とは病理組織学的に、または FACStar による表現型検索で診断の確定し得なかった症例で 13 例あり、IBL 疑いを 1 例含んでいた。このうち 8 例に対し遺伝子検索を行い 5 例が B 細胞型、1 例が T 細胞型であった。再構成を認めなかったものも 2 例あり遺伝子型は不明であった。CALL は 1 例のみ遺伝子解析を行い、Ig 重鎖遺伝子に再構成を認め B 細胞型系列に含まれる腫瘍であることが確認された。骨髄性白血病は 3 例の CML blast crisis を含む 6 例の検索を行ったが、2 例の CML lymphoid crisis に Ig 遺伝子の再構成が認め

られ B 細胞型の crisis と診断した。再構成を認めなかった 4 例は CML の myeloid crisis, 残りの 3 例は AML と診断した。ホジキン病は 6 例遺伝子解析を行ったが、いずれの症例にも遺伝子再構成は認められなかった。良性疾患, および転移癌を有するリンパ節の遺伝子も検索したがいずれも再構成は認められなかった。遺伝子解析を行った 62 症例中 B 細胞型腫瘍は 29 例, T 細胞腫瘍が 8 例, 二重遺伝子型腫瘍が 3 例見られた。

3.3 表現型と遺伝子再構成の関連

3.3.1 単一遺伝子型腫瘍

遺伝子再構成を認めた 40 例中 37 例の腫瘍は Ig 遺伝子もしくは TcR 遺伝子のいずれか一方にのみ再構成を起こしていた (Table 1)。このうち表現型のみで診断のついた 31 例はすべて表現型と遺伝子型が一致してお

り, 表現型と遺伝子型が相反する例は見られなかった, このうち主な症例を Table 2-1 に示す。

症例 87-49 は L 26 が陽性であり Ig 重鎖, Ig κ 鎖遺伝子に再構成が認められた (Fig 1)。また症例 88-31 の様に Ig 重鎖および Ig κ 鎖, Ig λ 鎖に遺伝子再構成を認めた症例も認められた。症例 88-51 は L 26 と DR が陽性であり Ig 重鎖遺伝子にのみ再構成が認められた (Fig 2)。症例 88-79 と症例 90-01 は L26, L29, L30, DR が陽性であり症例 88-79 は Ig κ 鎖に (Fig 3), 症例 90-01 は Ig λ 鎖にのみ遺伝子再構成を認めた。症例 88-70 T3, L3 が陽性であり TCR β 鎖遺伝子にのみ再構成を認めた。症例 89-43 は T3, DR が陽性であり TCR β 鎖および TCR δ 鎖の双方に再構成を認めた (Fig 4)

Table 1 Histological Diagnosis and Analysis of Genotype on 62 Cases

Phenotype	Total	No. Cases Analysis of genotype	Rearranged			G-1 ^{*1}
			Ig	TCR	Bigenotype	
B cell type	54	22	21	0	1	0
T cell type	34 ^{*2}	9	0	7	2	0
Unclassified	13 ^{*3}	8	5	1	0	2
CALL	8	1	1	0	0	0
Myelocytic	9	6	2	0	0	4
Hodgkin's D	10	6	0	0	0	6
Lymphadenitis	29	5	0	0	0	5
Ca. Metastasis	4	1	0	0	0	1
Others	57	4	0	0	0	4
Total	218	62	29	8	3	22

*1: Germline

*2: including 4 cases of IBL-T

*3: including 1 case of IBL

Table 2-1 Cases which showed Gene Rearrangement of either Ig or TcR

Case	Clinical & Histologic Diagnosis	B-phenotype			T-phenotype				NT, NB-phenotype					Probe				
		CD20 L26	L29	L30	CD5 L1	CD3 T3	CD8 L2	CD4 L3	CD30 Ki-1	CD13 MY7	CD10 J5	CD38 L4	DR	JH	c κ	c λ	TcR β	TcR δ
87-49	DSC, B	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	R	G	G	ND
88-31	CML Ly Cris		+	+	+	-	-	-		+	+	+	+	R	R	R	G	G
88-51	DL, B	+		-	-		-	-	-	-		-	+	R	G	G	G	G
88-79	DL, B	+	+	+	-	-	-	-			-	-	+	G	R	G	G	G
90-01	DM, B	+	+	+	-	-		-	-				+	G	ND	R	ND	G
88-70	ATL					+	-	+				-	-	G	G	G	R	G
89-43	DM, T	-			-	+	-	-					+	G	G	ND	R	R

DSC, B=non-Hodgkin lymphoma (NHL) small cleaved B cell type

CML Ly Cris=chronic myelocytic leukemia lymphoid crisis DL, B=NHL diffuse large B cell type

DM, B=NHL diffuse mixed B cell type ATL=adult T cell Leukemia

DM, T=NHL diffuse mixed T cell type

+: positive -: negative R: rearranged G: germline configuration ND: not done

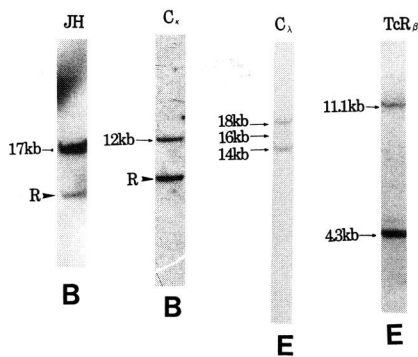


Fig. 1 Rearrangement of the immunoglobulin heavy and kappa light chain gene but not the lambda light chain and T cell receptor beta chain gene were detected in case 87-49, indicating B cell lineage.

B=BamH I; E=EcoR I;

R=rearrangement; arrows=germline

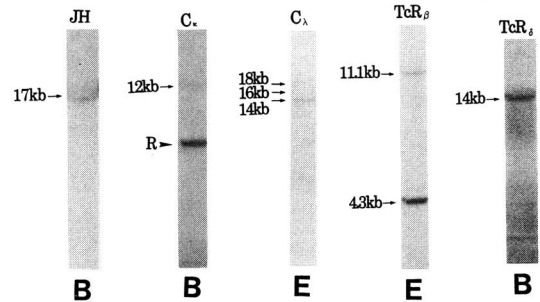


Fig. 3 Rearrangement of the immunoglobulin kappa light chain gene but not the immunoglobulin heavy chain gene, T cell receptor beta and delta chain gene were detected in case 88-79, indicating B cell lineage.

B=BamH I; E=EcoR I;

R=rearrangement; arrows=germline

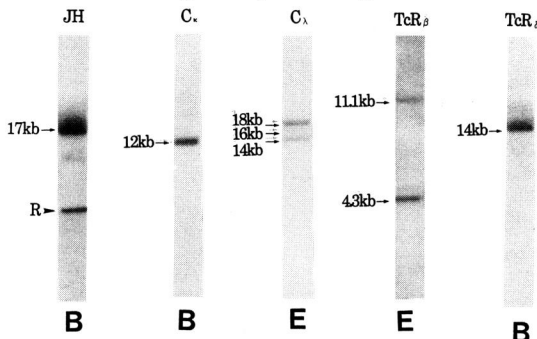


Fig. 2 Rearrangement of the immunoglobulin heavy chain gene but not the immunoglobulin light chain genes, T cell receptor beta and delta chain gene were detected in case 88-51, indicating B cell lineage.

B=BamH I; E=EcoR I;

R=rearrangement; arrows=germline

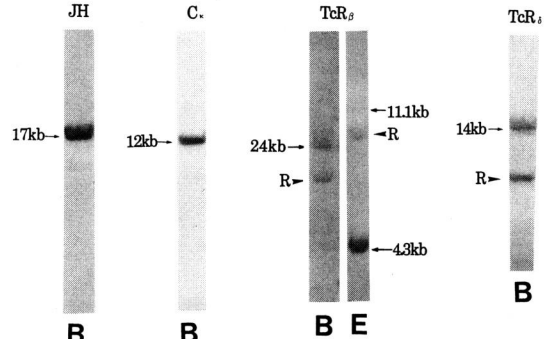


Fig. 4 Rearrangement of the T cell receptor beta and delta chain gene but not immunoglobulin heavy and kappa light chain gene were detected in case 89-43, indicating $\gamma\delta$ -T cell lineage.

B=BamH I; E=EcoR I;

R=rearrangement; arrows=germline

Table 2-2 Cases which were not classified by Phenotype

Case	Clinical & Histologic Diagnosis	B-phenotype			T-phenotype				NT, NB-phenotype					Probe					Pathological Diagnosis
		CD20 L26	L29	L30	CD5 L1	CD3 T3	CD8 L2	CD4 L3	CD30 Ki-1	CD13 MY7	CD10 J5	CD38 L4	DR	JH	cκ	cλ	TcRβ	TcRδ	
88-60	DSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND	ND	G	ND	DSC
89-13	LBL susp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	G	G	G	G	LBL susp.
88-82	AUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	ND	ND	G	ND	ALL, B
89-47	DM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	ND	ND	G	ND	DM, B
90-18	DSC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R	G	ND	G	G	DSC, B
89-24	AML/ALL	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	R	R	G	G	G	ALL, B
89-40	DM	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	R	R	G	G	G	DM, B
*90-22	IBL susp.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	G	ND	ND	R	ND	IBL-T

DSC=NHL diffuse small cleaved LBL susp.=NHL lymphoblastic suspected

AUL=acute undifferentiated leukemia DM=NHL diffuse mixed AML=acute myelocytic leukemia

ALL=acute lymphoblastic leukemia IBL susp.=Immunoblastic lymphadenopath *: also shown in Table 2-3

+: positive -: negative R: rearranged G: germline configuration ND: not done

3・3・2 分類不能型腫瘍 (Table 2-2)

遺伝子解析を行った症例のうちマーカー検索で細胞系列を決定, および判定不能であった症例は8例でありそのうち6例に単一の遺伝子型が認められた。

症例 88-60 は形態的には非ホジキンリンパ腫 diffuse small cleaved であったが免疫染色では陽性を示す細胞が存在せず, 表現型は不明であった。遺伝子解析においても Ig 重鎖および TCR β 鎖に遺伝子再構成を認めず腫瘍細胞の起源は同定不能であった。

症例 89-13 は型態的には非ホジキンリンパ腫 lympholastic の様子を呈しており T 細胞性の単クローン抗体陽性細胞が多数を占めていたが, この腫瘍は白血化し末梢リンパ球のほとんどが B 細胞抗原を発現しており表現型の確定が困難であった。遺伝子検索においても Ig 遺伝子および TCR 遺伝子の全てに再構成を認めずその細胞起源を同定し得なかった。

症例 88-82 は使用した抗体がすべて陰性であり acute undifferentiated leukemia (AUL) の診断であったが遺伝子検索により Ig 重鎖遺伝子の再構成を認め, B 細胞に移行した細胞の白血病と診断した。

症例 89-47 は, その病理組織から非ホジキンリンパ腫 diffuse mixed と診断したが, マーカー検索に耐える材料が得られず細胞起源は同定できなかった。しかし, 遺伝子検索において Ig 重鎖遺伝子の再構成を認め, B 細胞型であることが判明した。

症例 90-18 は, パラフィン切片では, び慢性に増殖する細胞集団を認め, 非ホジキンリンパ腫 diffuse small cleaved と診断したが, 免疫染色においては確実に陽性となる細胞集団は認められず表現型は不明であった。遺伝子検索では Ig 重鎖遺伝子に再構成を認めたため, B 細胞型腫瘍と診断した。

症例 89-24 はペルオキシダーゼが陰性であり ALL の可能性が強く考えられたが MY 7 陽性の細胞が出現しており, AML の可能性も残されていた例である。遺伝

子検索により Ig 重鎖遺伝子と Ig κ 鎖遺伝子に再構成が見られ, B 細胞性リンパ性白血病と考えられた。

症例 89-40 はパラフィン切片では小細胞と大細胞が混在しており免疫染色においてもその細胞起源を同定できなかったが遺伝子検索では Ig 遺伝子に再構成を認め, 鏡検所見と併せて B 細胞型の非ホジキンリンパ腫 diffuse mixed と診断した。

症例 90-22 はリンパ節の基本構造は失われており全体的に IBL, IBL 様 T 細胞リンパ腫, atypical hyperplasia などが疑われたが T 細胞性悪性リンパ腫を直接示唆する所見はなく IBL 様病変と診断した例である。遺伝子診断においては TcR β 鎖遺伝子の再構成を認め IBL 様 T 細胞リンパ腫と診断した。

3・3・3 IBL-T/AILD (Table 2-3)

1 例の IBL 疑いを含む 4 例の遺伝子を検索し全例に TCR 遺伝子の再構成を認めた。

症例 89-20 (Fig. 5), 症例 90-43 は TCR β 鎖のみに, 症例 90-21 は TcR δ のみに再構成を起こしており, いずれも T 細胞性の腫瘍であることが判明した。尚, こ

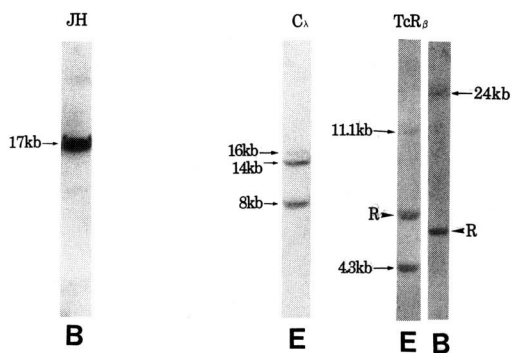


Fig. 5 Rearrangement of the T cell receptor beta chain gene but not immunoglobulin heavy and lambda light chain gene were detected in case 89-20, indicating T cell lineage. B=BamH I; E=EcoR I; R=rearrangement; arrows=germline

Table 2-3 IBL like T/AILD

Case	Clinical & Histologic Diagnosis	CD20 L26	MT1	JH	c κ	c λ	TcR β	TcR δ
89-20	IBL-T	—		G	ND	ND	R	ND
90-21	IBL-T	—	+	G	ND	ND	G	R
*90-22	IBL susp.			G	ND	ND	R	G
90-43	AILD	—		G	ND	ND	R	ND

IBL=immunoblastic lymphadenopathy

IBL-T=IBL like T cell lymphoma

AILD=angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia

*: also shown in Table 4-2 +: positive -: negative R: rearranged

Table 2-4 Cases which showed both Ig and TcR Gene Rearrangement

Case	Clinical & Histologic Diagnosis	B-phenotype			T-phenotype				NT, NB-phenotype					Probe				
		CD20 L26	L29	L30	CD5 L1	CD3 T3	CD8 L2	CD4 L3	CD30 Ki-1	CD13 MY7	CD10 J5	CD38 L4	DR	JH	cκ	cλ	TcRβ	TcRδ
88-44	HCL		+	-	-		-	-	-			+	+	G	G	R	R	ND
88-34	DL, T	-												R	ND	ND	R	ND
89-46	DL, ATLL	-	+	-		+		-	-		-	+	+	R	ND	ND	R	ND

HCL=hairy cell leukemia DL, ATLL=NHL diffuse large adult T cell leukemia/lymphoma

DL, T=NHL diffuse large T cell type

+: positive -: negative R: rearranged G: germline configuration ND: not done

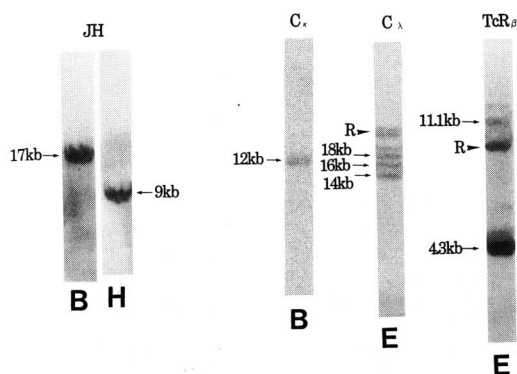


Fig. 6 Rearrangement of the immunoglobulin lambda light chain gene and T cell receptor beta chain gene but not immunoglobulin heavy and kappa chain gene were detected in case 88-44, indicating dual genotype. B=BamH I; E=EcoR I; H=Hind III; R=rearrangement; arrows=germline

の表で述べられている症例 90-22 は Table 4-2 にのせてある分類不能型の症例と同一のものである。

3・3・4 二重遺伝子型腫瘍 (Table 2-4)

症例 88-44 は B 細胞性腫瘍である Hairy cell leukemia (HCL) の症例で Igλ 鎖と TcRβ 鎖の双方に遺伝子再構成を起こしており (Fig 6) 通常の HCL に比して α-IFN による治療抵抗性が大でありかつ予後不良であった。症例 88-34, 89-46 はいずれも T 細胞性非ホジキンリンパ腫 diffuse large で症例 89-46 は臨床的に成人性 T 細胞白血病/リンパ腫と診断された例である。何れの症例も Ig 重鎖と TcRβ 鎖の双方に遺伝子再構成を起こしていたが症例 89-46 は治療抵抗性、予後に関

Table 3-2 Diagnosis of the Cases by Phenotype and Genotype

Rate	Phenotype 205/218=94%	Phenotype+genotype 205+6/218=97%
------	--------------------------	-------------------------------------

しては通常の T 細胞性リンパ腫と変わらなかった。症例 88-34 は治療抵抗性、予後に関する詳細は不明であった。

3・4 遺伝子型の検出頻度 (Table 3-1, 3-2).

遺伝子解析総数 62 例中非ホジキンリンパ腫および慢性骨髄性白血病の lymphoid crisis を含むリンパ性白血病の総数は 42 例であり、32 例 (76%) に Ig 遺伝子もしくは TCR 遺伝子の再構成を認めた。また Igκ 鎖のみ再構成を起こしている例が 3 例 (7.1%), Igλ 鎖のみに再構成を認めた例が 1 例 (2.3%), TCRδ 鎖のみに再構成を起こしている例が 1 例 (2.3%), 二重遺伝子型腫瘍は 3 例 (7.1%) 認められた。再構成の検出されなかった症例も 2 例 (4.8%) 認められた。表現型を検索した 218 例のうち病理組織学的な検索および FACStar を用いたマーカー検索で診断を確定できなかった例 (分類不能型) は 13 例であり表現型のみ診断率は 94%

Table 4-1 Detection of Bcl-2 Rearrangement in NHL Cases by PCR

B cell lymphoma	
Follicular	1/ 3 (33.3%)
Diffuse	0/12 (0%)
Others	0/12 (0%)

Table 3-1 Analysis of Cases of NHL and Lymphocytic Leukemia* using each Probe

	Rearrangement					Gemline	Total
	Ig or TcR	κ chain only	λ chain only	TcRδ chain only	Bigenotype		
No.	32	3	1	1	3	2	42
Rate	76%	7.1%	2.3%	2.3%	7.1%	4.8%	100%

*: including CML lymphoid crisis



Fig. 7 Detection of bcl-2 translocation by PCR.
Amplification band was seen in lane 68(89-52).
P: positive control (SUDHL6 cell line)
MK: pBR Hinf I maker (end labeled)

(218-13/218)であった。遺伝子診断では分類不能型のうち6例が遺伝子解析で診断可能であり、遺伝子診断を含めた診断率は、97% (205+6/218)であった。

3・5 bcl-2再構成の検索 (Table 4-1).

濾胞性 B 細胞リンパ腫の1例にのみ bcl-2 の再構成を認めた。Fig. 7 に示す様に症例 89-52 (No. 68) で約 200 bp のところに band が認められた。この症例は Ig 遺伝子検索でも Ig 重鎖および λ 鎖に再構成が認められた。

3・6 EBV 遺伝子の有無の検索 (Table 4-2).

B 細胞リンパ腫で1例認められ、T 細胞リンパ腫では2例で、ホジキン病でも3例に認められ、adenocarcinoma の転移を有するリンパ節からのものが1例あ

Table 4-2 Detection of EBV Gene

B cell lymphoma	1/22 (4.5%)
T cell lymphoma	2/ 9 (22.2%)
AILD/IBL-T	3/ 4 (75%)
Hodgkin's Disease	3/ 5 (60%)
Tbc. Lymphadenitis	1/ 1 (100%)
Adeno. Ca meta	1/ 2 (50%)
Total	11

AILD=angioimmunoblastic lymphadenopathy with dysproteinemia

IBL-T=immunoblastic lymphadenopathy like T cell lymphoma

Tbc.=Tuberculous

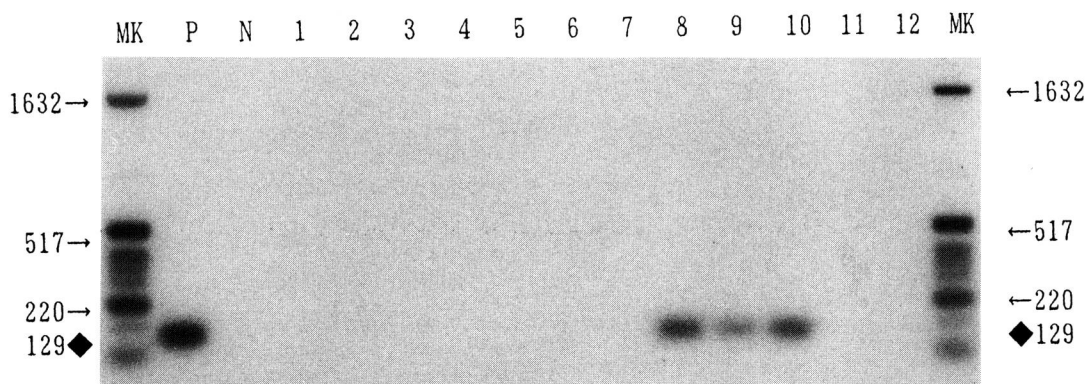


Fig. 8 Detection of EBV gene by PCR.
Amplification was seen in lane 8(87-60), 9(87-61), 10(87-66)
P: positive control (Raji cell line)
N: negative control (Ramos cell line)
MK: pBR Hinf I maker (end labeled)

た。それ以外の疾患には認められなかった。EBV gene の検出の例を Fig. 8 に示す。症例 87-60 (No. 8), 87-61 (No. 9), 87-66 (No. 10) は EBV gene を有する例であり、いずれも 129 bp のところに band が認められる。

4 考 察

4.1 単一遺伝子型腫瘍

表現型で診断が確定した単一遺伝子型腫瘍の中で遺伝子型が表現型と相反する症例は認められなかった。遺伝子診断においてはこのことが一番重要なことである。なぜならば遺伝子解析が求められた背景には表現型の検索では診断がつかない症例が存在したからである。今回の結果より、表現型が不明である症例においてもどちらか一方の遺伝子に再構成を検出することにより、その細胞起源系列を推定することが可能であった。ただ、遺伝子診断を行う場合に気を付けねばならないことは使用する probe の種類である。今回の症例の内、非ホジキンリンパ腫およびリンパ性白血病の約 1 割は J_H probe で Ig 重鎖遺伝子の再構成の検出が不能であった。このように $C\kappa$ probe では遺伝子再構成を検出し得るが J_H probe では検出不能な例は他施設でも報告されている¹⁸⁾。よって B 細胞性腫瘍に対する probe として、 J_H のみならず $C\kappa$ および、 $C\lambda$ を使用することがより正確で確実な診断を下す上で必要である。また、 $C\beta$ probe では再構成を検出し得なかった T 細胞性腫瘍も 1 例認められた。この症例は TCR δ 鎖遺伝子のみ再構成を起しており TCR β 鎖遺伝子に対する probe のみならず TCR δ 鎖遺伝子に対する probe をも使用することは充分意義のあることと考えられる。これらの probe の使用により以下のことが判明した。まず、分類不能型 8 例のうち 6 例の診断が可能となり、遺伝子診断の有効性が確認された。この中で非ホジキン病 diffuse mixed small and large cell type (DML) は組織学的に heterogeneous であり、形態学的解析によってその細胞起源を推定することは困難であると考えられている¹⁹⁾。よって、DML の診断には遺伝子解析がぜひとも必要であり、また、非常に有効な診断法といえる。次に、CML lymphoid crisis の 2 例はいずれも B 細胞性であることが判明した。CML の blast crisis に対する遺伝子解析はいくつか報告されており²⁰⁾、lymphoid blast crisis には Ig 遺伝子の再構成が認められ、myeloid blast crisis には再構成が認められないと考えられている。我々の結果もこれらの報告に矛盾せず、しかも再構成を示した遺伝子はすべて Ig 遺伝子であり、上記の

報告と併せると CML の lymphoid blast crisis には T 細胞型のものは存在しないか、してもわずかである可能性が考えられる。

IBL like T/AILD は 4 例認められた。AILD は従来反応性病変と考えられており IBL²¹⁾ などと一緒に AILD 型病変と呼ばれていたものであるが、下山ら²²⁾ はこの疾患群を IBL 様 T 細胞リンパ腫とすることを提唱した。その後、AILD, IBL の中で TCR β 鎖遺伝子²³⁾、Ig および TCR β 鎖の双方の遺伝子²⁴⁾、さらには TCR β 鎖かつ TCR δ 鎖遺伝子²⁵⁾ に再構成が認められた症例が報告されている。よって、これらの疾患群のなかには T 細胞性リンパ腫がかなり多く含まれていると考えられている。我々も 4 例すべてに TcR 遺伝子に再構成を認めており、この 4 例は明らかに T 細胞リンパ腫であると考えている。AILD を良性の増殖性疾患と考えている研究者もあるが²⁶⁾、我々の結果は T 細胞の単クローン性増殖の証明を通して、これらが腫瘍性のものであることを明確に示している。

4.2 二重遺伝子型の症例

遺伝子を解析した全症例中 3 例に Ig 遺伝子および TCR 遺伝子の再構成が認められ、これは非ホジキンリンパ腫およびリンパ性白血病の症例の内の 7.1% に相当する。一般的には白血病およびリンパ腫のうち 4-10% の症例が Ig 遺伝子および TCR 遺伝子の双方に再構成を起していると考えられている²⁷⁾。これら二重遺伝子型の症例は単一遺伝子型の腫瘍に比べて予後が不良であるか否かに関しては明かではない²⁸⁾。我々の経験した 3 例の内症例 89-46 の症例は治療抵抗性に関しては単一遺伝子型リンパ腫との差異を認めなかったが、症例 88-44 は interferon- α (IFN- α) の治療に抵抗性を示し予後不良であった。Steven ら²⁹⁾ も Ig 遺伝子と TCR 遺伝子の双方に再構成を認めた HCL が IFN α の治療に抵抗性を示したと報告している。他にも、二重遺伝子型の HCL の予後が不良であるという報告があり³⁰⁾、HCL に関しては早期に Ig 重鎖のみならず TcR β 鎖遺伝子の検索をも行うべきである。

4.3 遺伝子再構成を認めなかった症例

分類不能型で 2 例 (4.8%) の非ホジキンリンパ腫に遺伝子再構成を認めなかった。一般的に表現型が B 細胞性または T 細胞性であるリンパ腫のうち遺伝子の再構成の見られないものが 3-38% あると言われている²⁹⁾³⁰⁾。なぜ遺伝子再構成が認められないかについては、いくつかの可能性が考えられる。まず、腫瘍細胞由来の遺伝子の割合が低すぎて再構成 band を検出できないためである。一般に病変内に 5-10% 以上のモノクローナル

な細胞があれば再構成 band として検出でき¹³⁾ 当教室においても同程度であるが、これ以下であると検出不能と考えられている。我々は、組織のごく1部に腫瘍細胞が存在している症例では、鏡検によってその組織に出現している腫瘍細胞の割合、部位を決め、腫瘍細胞になるべく多く存在している部位をいくつか切り出し、その遺伝子を検索している。ただ、白血病では組織のようにいくつかに切り出すことはできないが、FACStar のソーティング機能を使用することにより、腫瘍細胞を選別しその遺伝子を解析することは可能である。次に、ある probe によって検出された再構成 band が、偶然 germline band とほぼ同じ位置に出現したために区別がつかなくなった事が考えられる。この場合には、他の制限酵素を使用することにより再構成 band を検出できる可能性がある。3 番目は使用する probe の種類である。再構成 band の検出できない症例の多くは、probe として C λ を使用していない点である¹⁶⁾。この理由の1つには λ 鎖遺伝子の3本の germline band が非常に接近しており、かつ λ 鎖遺伝子の解析に制限酵素 EcoRI を使用したときには germ line が2型存在し³¹⁾、判定に注意を要するためである。我々は前述した様に Ig λ 鎖遺伝子にのみ再構成を起こしている症例を経験している。よって、上記の症例のいくつかは C λ probe を使用することにより再構成を検出できる可能性が充分考えられ、我々の使用している7種類の probe はリンパ性悪性腫瘍の診断においてぜひとも必要であると思われる。ホジキン病は6例の遺伝子を解析したがいずれも再構成を起こしている遺伝子は認められなかった。ただ、前述の理由により遺伝子再構成の検出が不能である可能性も残されている。その他 Lymphadenitis、転移性癌、その他の症例には遺伝子再構成を認めなかった。

4・4 遺伝子診断の有効性とその限界

病理組織学的、および免疫組織学的検索のみによる診断率は94%であり、これに遺伝子検索を加えた診断率は97%であった。Kyriakos ら³²⁾ は65例のリンパ性悪性腫瘍を解析し表現型のみの検索では診断率は94% (61/65) であり、遺伝子型のみの検索では89% (58/65) であったと報告している。また、Deepak ら³³⁾ は形態学的検索のみの診断率が64%、これに免疫組織学的検索を加える82%となり、遺伝子検索を併用することにより最終的に診断率が91%となったと報告している。これらの結果を考えると我々の診断率は他施設に比べて決して劣ることはなく、むしろかなり高いのではないと思われる。ただ、3%の診断率の向上のために遺

伝子診断を行う事については異論があるかもしれないが、この3%は病理組織学的および免疫組織学的検索のみでは決して埋められない数値であり、94%の診断率は現時点での表現型のみの診断による限界である。病理診断は正確を期することが第一であり診断不能例をできるだけ減じていく事が要求される。そのために従来の診断の限界を越える新しい診断方法が常に要求されるのである。確かに、遺伝子診断の導入は、以前、単クローン抗体による免疫組織学的診断が導入された時のような飛躍的な診断率の向上は望めないが、現在使用されている方法による診断の限界を破る手技としてぜひとも必要と考えられ、かつ遺伝子による解析が唯一単クローン性を証明し得る手技なのである。また凍結組織切片作製が困難な状態の悪い組織からでも遺伝子採取することができ、診断が可能である事は画期的な事である。遺伝子診断の限界については今までも述べてきたが、Ig 遺伝子および TCR 遺伝子の双方に再構成の見られる症例が存在すること、またこれとは逆に Ig 遺伝子および TCR 遺伝子の双方に再構成の見られないリンパ腫が存在することである。つまり再構成の認められない症例はリンパ性悪性腫瘍ではないとは必ずしも断言できず、また逆に、再構成 band の出現した症例が必ずしも悪性であるとは断言できない事である。遺伝子の検索は細胞の単クローン性を見ているのであって、決して悪性細胞を検索しているのではない。ある単クローン細胞集団数の全体に占める割合がサザンプロット法の検出感度以上あれば当然再構成 band として出現する。ただ、大量の単クローン細胞の増殖は一般的に悪性腫瘍に認められるために再構成 band が検出された時には悪性であるとしているだけなのである。一部の反応性リンパ節炎などは clonal な細胞がかなり増殖しているため band が見られる可能性もあり、サザンプロット法の判定には注意が必要である。

4・5 Polymerase chain reaction (PCR) 法による解析

4・5・1 bcl-2 再構成の検索

非ホジキンリンパ腫 follicular type は、多くの場合、第14番染色体と第18番染色体の相互転座 t (14:18) (q 32:q 21) が起こることが知られている³⁴⁾。18 q 21 には protooncogene の bcl-2 遺伝子を含む major breakpoint region (MBR) があり、この部位の bcl-2 遺伝子が切断されて、14 q 32 にある Ig 重鎖遺伝子の J 領域の近傍へ転座する。よって、PCR 法³⁵⁾ により MBR と H 鎖 J 領域を primer として作製した probe を使用することによって bcl-2 遺伝子の再構成を検出できる事が報

告されている¹⁶⁾。我々の行った結果は Table 4-1 に示す様に、DNA を抽出した内 1 例に bcl-2 の再構成がみられ、この症例は B 細胞性非ホジキンリンパ腫 follicular small cleaved であった。検索した follicular lymphoma は 3 例であるので頻度は 33% であった。また、follicular lymphoma 以外の症例についても検索したがやはり再構成は認められなかった。欧米の follicular lymphoma では高率に bcl-2 遺伝子の再構成が認められる³⁶⁾が、本邦では欧米の半数以下である³⁷⁾。今回の我々の結果もほぼ本邦の結果と同じであった。この PCR 法の利点は、ごく少量の遺伝子の検出が可能である点である。つまり、寛解時にある患者からごく少量の検体を採取することにより、再構成が認められれば、再発の可能性があり、認められなければ寛解状態にあることが判定でき、非常に有用な診断法と考えられる。

4.5.2 EBV gene に対する検索

PCR 法により EB virus の gene を検出する試みがいくつかの施設で行われるようになってきている²⁶⁾³⁸⁾。我々の結果は、Table 4-2 に示す様に B 細胞リンパ腫に 1 例認められた。一般的に EBV は B 細胞に感染するといわれているが、それ以外の様々な疾患にも認められる。AILD では 4 例中 3 例 (75%) に認められた。Hans²⁴⁾ は、7 例の AILD の内 5 例 (71%) に EBV gene を検出し AILD の病態には EBV が深くかかわっていると考えている。彼らは、AILD は本質的には良性疾患と考えており、AILD をリンパ性悪性腫瘍と考えている我々とは立場を異にするが、確かに我々の結果でも AILD には高率に EBV gene が認められており EBV の感染が AILD の発症にかかわっている可能性は否定できないであろう。ただ、PCR 法は非常に感度が高く腫瘍細胞以外の B 細胞に EBV が感染している場合、この gene を検出する可能性もあり、解析には細心の注意を払う必要がある。悪性リンパ腫以外にも EBV の gene が見られたが、おそらくこれらの症例は EBV の感染した B 細胞が存在したためと考えられる。

5 結 論

ヒトリンパ球に対する十数種類の単クローン性抗体と免疫グロブリン遺伝子および T 細胞受容体遺伝子に対する 7 種類の probe を使用しリンパ性悪性腫瘍の遺伝子解析を行い、その病態、予後および遺伝子診断の有用性を明らかにした。

1. AILD/IBL と呼ばれる一連の疾患群の中には明らかに T 細胞の単クローン性の増殖を示す疾患が存在し、T 細胞性腫瘍である可能性が高く、これらを IBL

様 T 細胞リンパ腫という独立した疾患とし、非ホジキンリンパ腫の中に組み入れるべきである。

2. リンパ性悪性腫瘍に対する形態および表現型のみの検索ではその診断率は 94% であり、7 種類の probe を使用した遺伝子検索を組み入れることにより診断率は 97% となり遺伝子検索は非常に有用な診断法と言える。

3. HCL における二重遺伝子型の検出は予後判定の重要な要素となり得るものであり両遺伝子型の検出を試みるべきである。

4. Polymerase chain reaction を用いた bcl-2 遺伝子再構成の解析は非ホジキンリンパ腫濾胞型 3 例中 1 例に認められ、これ以外の疾患には認められなかった。また、EBV gene については、B 細胞性腫瘍以外の疾患にも認められた。

謝 辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲をいただきました菊地浩吉学長に深く感謝致します。また、症例の検材を御提供いただきました市立釧路病院病理部長吉田豊先生、市立旭川病院川村詔導先生、旭川赤十字病院幸田久平先生、札幌厚生病院今野武津子先生その他多数の先生方に深く感謝致します。

文 献

1. Ishii, Y., Takei, T., Fujimoto, J. and Kikuchi, K.: Four distinct antigen systems on human thymus and T cells defined by monoclonal antibodies: immunohistological and immunochemical studies. *Clin. Exp. Immunol.* 53, 31-40 (1983)
2. Ishii, Y., Takami, T., Yuasa, H., Takei, T. and Kikuchi, K.: Two distinct antigen systems in human B lymphocytes: identification of cell surface and intracellular antigens using monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* 58, 183-192 (1984)
3. Takami, T., Ishii, Y., Yuasa, H. and Kikuchi, K.: Three distinct antigen systems on human B cell subpopulations as defined by monoclonal antibodies. *J. Immunol.* 134, 828-834 (1985)
4. Ishii, Y., Takami, T., Kokai, Y., Yuasa, H., Fujimoto, J., Takei, T. and Kikuchi, K.: A novel human B-lymphocyte antigen shared with lymphoid dendritic cells: characterization by monoclonal antibody. *Clin. Exp. Immunol.* 61, 624-632 (1985)
5. Kokai, Y., Ishii, Y. and Kikuchi, K.: Charac-

- terization of two distinct antigens expressed on either resting or activated human B cells as defined by monoclonal antibodies. *Clin. Exp. Immunol.* **64**, 38-391 (1986)
6. Yanagi, Y., Yoshikai, Y., Leggett, K., Clark, S. P., Aleksander, I. and Mak, T. W.: A human T cell-specific cDNA clone encodes a protein having extensive homology to immunoglobulin chains. *Nature* **308**, 145-149 (1984)
 7. Cossman, J., Zehnauer, B., Garrett, C. T., Smith, L. J., Williams, M., Jaffe, E. S., Hanson, L. O. and Love, J.: Gene rearrangements in the diagnosis of lymphoma/leukemia. Guideline for use based in a multiinstitutional study. *Am. J. Clin. Pathol.* **95**, 347-354 (1991)
 8. Ishii, Y., Fujimoto, J., Koshiba, H. and Kikuchi, K.: Isolation and partial characterization of a 72,000-dalton glycoprotein (Tgp 72) on human thymus and T cells: possible relationship to mouse Ly-1 antigen. *J. Immunol.* **126**, 2171-2176 (1981)
 9. 今 信一郎, 石井良文: ヒト TL 様抗原の単クローン性抗体による解析及びその抗原発現に対するインターフェロンの効果. *札幌医誌*. **53**, 183-200 (1984)
 10. 石井良文, 山口 晃, 小海康夫, 菊地浩吉: モノクローナル抗体による白血病・悪性リンパ腫の分類. *Med. Technol.* **14**, 108-117 (1986)
 11. Manson, D. Y., Comans-Bitter, W. M., Cordell, J. L., Verhoeven, M.-A. J. and Dongen, J. M.: Antibody L26 recognizes an intracellular epitope on the B-cell-associated CD20 antigen. *Am. J. Pathol.* **136**, 1215-1222 (1990)
 12. 石井良文, 今 信一郎: ヒト白血球分化抗原の発現と遺伝子支配. *日本臨床*. 第45巻, 2814-2822 (1987)
 13. Cleary, M. L., Chao, J., Warnke, R. and Sklar, J.: Immunoglobulin gene rearrangement as a diagnostic criterion of B-cell lymphoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 593-597 (1984)
 14. Baer, R., Boehm, T., Yssel, H., Spits, H. and Rabbitts, T. H.: Complex rearrangements within the human $J\delta$ - $C\delta$ / $J\delta$ - $C\alpha$ locus and aberrant recombination between $J\alpha$ segments. *EMBO J.* **7**, 1661-1668 (1988)
 15. Feinberg, A. P. and Vogelstein, B.: A technique for DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13 (1983)
 16. Medeiros, L. J., Lardelli, P., Stetler-Stevenson, M., Longo, D. L. and Jaffe, E. S.: Genotypic analysis of diffuse, mixed cell lymphomas. *Am. J. Clin. Pathol.* **95**, 547-555 (1991)
 17. Uhara, H., Sato, Y., Mukai, K., Akao, I., Matsuno, Y., Furuya, S., Hoshikawa, T., Shimosato, Y. and Saida, T.: Detection of Epstein-Barr virus DNA in Reed-Sternberg cells of Hodgkin's disease using the polymerase chain reaction and in situ hybridization. *Jpn. J. Cancer Res.* **81**, 272-278 (1990).
 18. Katzin, W. E., Linden, M. D., Fishleder, A. J. and Tubbs, R. R.: Immunophenotypic and genotypic characterization of diffuse mixed non-hodgikin's lymphomas. *Am. J. Pathol.* **135**, 615-621 (1989)
 19. Nathwani, B. N., Metter, G. E., Gams, R. A., Bartolucci, A. A., Hartsock, R. J., Neiman, R. S., Byrne, G. E., Barcos, M. B., Kim, H. and Rappaport, H.: Malignant lymphoma, mixed cell type, diffuse. *Blood* **62**, 200-208 (1983)
 20. Ford, A. M., Molgaard, H. V., Greaves, M. F. and Gould, H. J.: immunoglobulin gene organization and expression in haemopoietic stem cell leukemia. *EMBO J.* **2**, 997-1001 (1983)
 21. Lukes, R. J. and Tindle, B. H.: Immunoblastic lymphadenopathy A hyperimmune entity resembling Hodgkin's disease. *N. Engl. J. Med.* **292**, 1-8 (1975)
 22. 下山正徳, 湊啓輔, 渡辺昌: IBL 様 T 細胞リンパ腫. *病理と臨床*. **1**, 1683-1691 (1983)
 23. Frizzera, G., Kaneko, Y. and Sakurai, M.: Angioimmunoblastic lymphadenopathy and related disorders: a retrospective look in search of definitions. *Leukemia* **3**, 1-5 (1989)
 24. Lipford, E. H., Smith, H. R., Pittaluga, S. P., Jaffe, E. S., Steinberg, A. D. and Cossman, J.: Clonality of angioimmunoblastic lymphadenopathy and implications for its evolution to malignant lymphoma. *J. Clin. Invest.* **79**, 637-642 (1987)
 25. Tkachuk, D. C., Griesser, H., Takihara, Y., Champagne, E., Minden, M., Feller, A. C., Lennert, K. and Mak, T. W.: Rearrangement of T-cell δ locus in lymphoproliferative disorders. *Blood* **72**, 353-357 (1988)
 26. Knecht, H., Sahli, R., Shaw, P., Meyer, C., Bachmann, E., Odermatt, B. F. and Bachmann, F.: Detection of Epstein-Barr virus DNA by polymerase chain reaction in lymph node biopsies from patients with angioimmunoblastic lymphadenopathy. *Br. J. Haematol.* **75**, 610-614 (1990)
 27. Pelicci, P.-G., Knowles, D. M. and Favera, R. D.: Lymphoid tumors displaying rearrangements of both immunoglobulin and T cell receptor gene. *J.*

- Exp. Med.** **162**, 1015-1024 (1985)
28. Davey, M. P., Bongiovanni, K. F., Kaulfersch, W., Quertermous, T., Seidman, J. G., Hershfield, M. S., Kurtzberg, J., Haynes, B. F., Davis, M. M. and Waldmann, T. A.: Immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement and expression in human lymphoid leukemia cells at different stage of maturation, **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **83**, 8759-8763 (1986)
 29. Giardina, S. L., Young, H. A., Faltynek, C. R., Jaffe, E. S., Clark, J. W., Steis, R. G., Urba, W. J., Mathieson, B. J., Gralnick, H., Lawrence, J., Overton, W. R. and Longo, D. L.: Rearrangement of both immunoglobulin and T-cell receptor genes in a prolymphocytic variant of Hairy cell leukemia patient resistant to interferon-alpha. **Blood** **72**, 1708-1716 (1988)
 30. Palumbo, A. P., Corradini, P., Battaglio, S., Omede, P., Coda, R., Boccadoro, M. and Pileri, A.: Dual rearrangement of immunoglobulin and T-cell receptor gene in a case of T-cell hairy-cell leukemia. **Eur. J. Haematol.** **46**, 71-76 (1991)
 31. Korsmeyer, S. J., Hieter, P. A., Ravetch, J. V., Waldmann, T. A. and Leder, P.: Developmental hierarchy of immunoglobulin gene rearrangements in human leukemic pre-B-cells. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** **78**, 7096-7100 (1981)
 32. Papadopoulos, K. P., Bagg, A., Bezwoda, W. R. and Mendelow, B. V.: The routine diagnosis utility of immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangement in lymphoproliferative disorders. **Am. J. Clin. Pathol.** **91**, 633-638 (1989)
 33. Kamat, D., Laszewski, M. J., Kemp, J. D., Goeken, J. A., Lutz, C. T., Platz, C. E. and Dick, F. R.: The diagnostic utility of immunophenotyping and immunogenotyping in the pathologic evaluation of lymphoid proliferation. **Mod. Pathol.** **3**, 105-112 (1990)
 34. Yunis, J. J., Oken, M. M., Kaplan, M. E., Ensrud, K. M., Howe, R. R. and Theologides, A.: Distinctive chromosomal abnormalities histologic subtypes of non-Hodgkin's lymphoma. **N. Engl. J. Med.** **307**, 1231-1236 (1982)
 35. Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. and Erlich, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, **Science** **239**, 487-491 (1988)
 36. Weiss, L. M., Warnke, R. A., Sklar, J. and Cleary, M. L.: Molecular analysis of the t (14; 18) chromosomal translocation in malignant lymphomas. **N. Engl. J. Med.** **317**, 1185-1189 (1987)
 37. Suchi, T., Lennert, K., Tu, L-Y., Kikuchi, M., Sato, E., Stansfeld, A. G. and Feller, A. C.: Histopathology and immunohistochemistry of peripheral T cell lymphomas: a proposal for their classification. **J. Clin. Pathol.** **40**, 995-1015 (1987)
 38. Telenti, A., Marshall, W. F. and Smith, T. F.: Detection of Epstein-Barr virus by polymerase chain reaction. **J. Clin. Microbiol.** **28**, 2187-2190 (1990)

別刷請求先:

(〒060) 札幌市中央区南1条西17丁目

札幌医科大学病理学第1講座 小野寺一史